

⑩ 日本国特許庁(JP) ⑪ 特許出願公開  
⑫ 公開特許公報(A) 昭64-61422

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和64年(1989)3月8日  
A 61 K 31/785 ADU 7431-4C  
// C 07 H 15/26 7417-4C  
審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 水溶性高分子制ガン剤

⑮ 特 願 昭62-217917

⑯ 出 願 昭62(1987)9月2日

⑰ 発 明 者 勢 藤 隆 群馬県前橋市下川町45-3  
⑱ 出 願 人 日本化薬株式会社 東京都千代田区富士見1丁目11番2号  
⑲ 出 願 人 財団法人微生物化学研 東京都品川区上大崎3丁目14番23号  
究会  
⑳ 代 理 人 弁理士 竹田 和彦

明 細 書

1. 発明の名称

水溶性高分子制ガン剤

2. 特許請求の範囲

酸性ポリアミノ酸のカルボキシル基にアミノ  
エトボシド及びアルカノールアミンをアミド結  
合で共有結合させた下記式(1)の構成単位を有す  
る水溶性高分子制ガン剤。



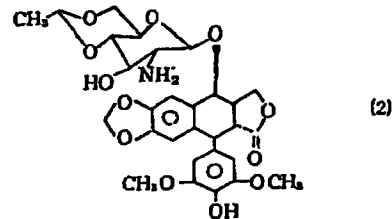
(式中、X,Yは各々次の意味を示す。)

X:一般式(2)で示される4-O-(2-ア  
ミノ-4,6-O-エチリデン-2-デ  
オキシ-β-D-グルコピラノシル)  
-4'-デメチル-4-エピボドフィロ  
トキシンのアミン残基。

Y:一般式(3)で示されるアルカノールアミ

ンのアミン残基。

またk, l, mは自然数であって構成単位の数  
を示し10<k+l+m<10,000である。nは1  
又は2である。)



(式中、R<sub>1</sub>は鎖状モノアルカノールもしくは  
ポリアルカノール残基を示す。)

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はその制ガン作用が改良された水溶性  
高分子制ガン剤に関するものである。

[従来の技術]

4'-デメチル-エピボドフィロトキシニン-β  
-D-エチリデングリコシド(一般名、エトボ

シド)は抗腫瘍作用を有する化合物として実際に臨床応用されている。又エトボシドの誘導体である4-O-(2-アミノ-4,6-O-エチリデン-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-4'-デメチル-4-エビポドフィロトキシシン(以後アミノエトボシドと称す。)はそれ自身エトボシドと同等の抗腫瘍効果をもつことは公知(特開昭60-32799号)である。制ガン剤を高分子化合物に結合する試みは種々おこなわれているがエトボシド及びエトボシドの誘導体についてはまだ試みられていない。

〔発明が解決しようとする問題点〕

上記のエトボシドは実験動物腫瘍系に於て幅広い抗腫瘍スペクトラムを有し、臨床においても肺小細胞癌、白血病、泌尿器癌、絨毛疾患などに優れた効果を示す制ガン剤であるが、水に対する溶解度が極めて小さく実際の治療時の注射及び経口投与に於て極めて苦勞しているのが現状である。我々は、種々のエトボシド誘導体を作製し水溶性エトボシドを可能にしたが毒性

の軽減の点ではいまだに不満足である。

最近、制ガン剤を高分子化することにより、その高い腫瘍内集積性のため正常細胞に対する毒性が軽減することや、血中での安定性の利点が論ぜられている。

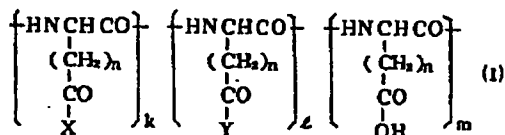
耐性癌についてもその腫瘍細胞への取り込みの機序の違いから有効性が期待される。

〔問題点を解決するための手段〕

高分子物質と制ガン剤とを化学結合させる際、血中では比較的安定で存在し、細胞内に取り込まれた後にその結合が切断されるアミド結合を使用することとした。上記のエトボシドには利用するアミノ基がないため、エトボシドの糖鎖の2-位の水酸基をアミノ基で置換したアミノエトボシドを使用した。高分子物質としては、生分解性のポリアミノ酸でアミノエトボシドのアミノ基とアミド結合で共有結合できるカルボキシル基を持つ酸性ポリアミノ酸を用いた。高分子制ガン剤の水溶性を増すため、アルコールアミンを高分子物質に結合させた。

こうして得られた水溶性高分子エトボシドは水溶性も著しく増加し、実験動物による抗腫瘍試験でも良好な抗腫瘍効果を示した。

即ち、本発明は、酸性ポリアミノ酸のカルボキシル基にアミノエトボシド及びアルコールアミンをアミド結合で共有結合させた下記式(1)の構成単位を有する水溶性高分子制ガン剤に関する。

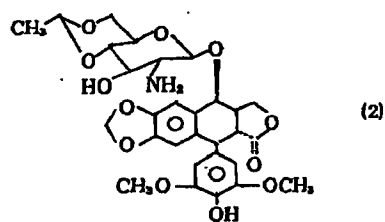


(式中、X、Yは各々次の意味を示す。)

X：一般式(2)で示される4-O-(2-アミノ-4,6-O-エチリデン-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-4'-デメチル-4-エビポドフィロトキシシンのアミン残基。

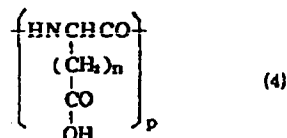
Y：一般式(3)で示されるアルコールアミンのアミン残基。

またk、l、mは自然数であって構成単位の数を示し $10 < k + l + m < 10,000$ である。nは1又は2である。)



(式中、R<sub>1</sub>は鎖状モノアルコールもしくはポリアルコール残基を示す。)

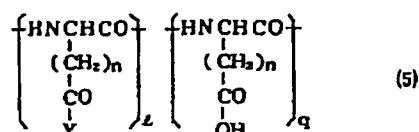
本発明の式(1)の構成単位を有する水溶性高分子制ガン剤を製造するには、例えば、式(4)



(式中、nは1又は2を表し、pは10～

1 0,000 の自然数を表す。)

で表される酸性ポリアミノ酸のカルボキシル基の一部を水又は緩衝溶液と極性有機溶媒の混合溶媒中でN-ヒドロキシスクシンイミドとジシクロヘキシルカルボジイミドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩等の縮合剤との反応で活性エステルを生成させたのち前記一般式(3)で示されるアルコールアミンと反応させ、式(5)の構成単位を有する水溶性ポリアミノ酸を得ることができる。



(式中、Yは一般式(3)で表されるアルコールアミンのアミン残基を示す。L, qは自然数で  $10 < L+q < 10,000$  を表す。nは1又は2である。)

ここで用いられるアルコールアミンとしては、エタノールアミン、3-アミノ-1,2-プロパ

ましい。極性有機溶媒としては、ジメチルホルムアミド、ジエチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジオキサランなどを用いることができる。反応は-4〜80℃において30分間〜2日間撹拌下行う。反応液の精製はろ過後、透析、ゲルろ過等の方法で行うことができる。精製液を真空乾燥することで水溶性ポリアミノ酸を得ることができる。溶液のままで次の反応を行っても差し支えない。得られた水溶性ポリアミノ酸のカルボキシル基をアルカリ滴定することによりアルコールアミンの結合量を求めることができる。

式(1)の構成単位を有する水溶性高分子制癌剤は、式(5)の構成単位を有する水溶性ポリアミノ酸と一般式(2)で示されるアミノエトボシドとを上記の反応と同様の方法で反応させることにより得ることができる。すなわち水又は緩衝溶液と極性有機溶媒の混合溶媒中で式(5)の構成単位を有する水溶性ポリアミノ酸のカルボキシル基

ンジオール、1-アミノプロパン-2-オール、2-アミノプロパン-1-オール、1-アミノプロパン-3-オール、1-アミノブタン-2-オール、2-アミノブタン-1-オール、3-アミノブタン-1-オール、1-アミノブタン-4-オール、2-アミノプロパン-1,3-ジオール、2-アミノ-2-メチルプロパン-1,3-ジオール、2-アミノ-2-エチルプロパン-1,3-ジオール、2-アミノ-2-オキシメチルペンタン-1-オール、トリス(オキシメチル)アミノメタン、1-アミノ-2,2-ビス(オキシメチル)プロパン-3-オール、等の水溶性の脂肪族第一級アルコールアミンが好ましい。アルコールアミンの結合は、ポリアミノ酸に対して所定量のアルコールアミンとN-ヒドロキシスクシンイミドを縮合剤の存在下反応させることで調節出来る。

アルコールアミンの結合量は、ポリアミノ酸を構成するアミノ酸に対して、5モル%〜90モル%が望ましく、特に10〜50モル%が好

の一部をN-ヒドロキシスクシンイミドとジシクロヘキシルカルボジイミド又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩等の縮合剤との反応で活性エステルとしたのち一般式(2)で示されるアミノエトボシドを上記したと同様の反応条件で反応させることにより高分子化アミノエトボシドを得る。又アルコールアミンとアミノエトボシドを同時に縮合することも可能である。反応後透析操作又はゲルろ過法により不必要な低分子物質を反応液から除き、精製液を凍結乾燥し目的とする水溶性高分子アミノエトボシドを得る。アミノエトボシドの結合量は、ポリアミノ酸を構成するアミノ酸に対して5〜50モル%が好ましく、より好ましくは10〜40モル%である。又、本発明で使用されるポリアミノ酸としてはグルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸のホモまたはコポリマーが挙げられる。

得られる水溶性高分子アミノエトボシドは、IRスペクトル、UVスペクトルから目的物を

確認した。高分子アミノエトボシド中のアミノエトボシド含量はUV吸収法を用いて測定出来る。

本発明の式(1)の構成単位を有する水溶性高分子制ガン剤は、所望に応じナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等の薬理的に許容しうる塩に変えたのち制ガン剤として用いてもよい。

#### (実施例)

以下に、本発明の実施例を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1.

本発明の化合物(No. 1)を以下のように作製した。

ポリ-L-グルタミン酸(平均分子量300,000)500gに水20ccを加え、攪拌しながらN-ヒドロキシスクシンイミド220g、ジシクロヘキシルカルボジイミド500g、エタノールアミン150gをジメチルホルムアミド20ccに溶解した液をゆっくり加えた。攪拌しながら室温で一夜反応後、

ル基が残存していることを確認した。次にここで得られたエタノールアミン修飾ポリ-L-グルタミン酸500gを15mlの水に溶解し、6mlのジメチルホルムアミドに溶解したN-ヒドロキシスクシンイミド70g、ジシクロヘキシルカルボジイミド150gを加え、攪拌しながら室温で30分間反応させたのち、アミノエトボシド440gのジメチルホルムアミド溶液6mlを加え室温で一夜反応した。反応後沈澱物をロ別し、ロ液をSephadex G-25カラムにかけ、UVモニター(280nm)を用いフラクションコレクターで高分子分画を分取した。分取液を凍結乾燥し固形物330gを得た。IRスペクトル、UVスペクトルよりアミノエトボシドがアミド結合で高分子物質と結合していることを確認した。一部をサンプリングし、283nmのUV吸収より固形物中のアミノエトボシド濃度を29.5重量%と算出した。

#### 実施例 2.

本発明の高分子制ガン剤(No. 2)を次のよう

沈澱物をロ別し、ロ液を水で2日間透析し未反応低分子物質を除いた。その後透析液を凍結乾燥し、固形物550gを得た。一部をサンプリングしアルカリ滴定でカルボキシル基を定量し48%のカルボキシ

に作製した。

ポリ-L-アスパラギン酸(平均分子量50,000)450gに水20mlを加え、攪拌しながらN-ヒドロキシスクシンイミド220g、ジシクロヘキシルカルボジイミド500g、3-アミノ-1,2-プロパンジオール225gをジメチルホルムアミド20mlに溶解した液をゆっくり加えた。攪拌しながら室温で一夜反応後、沈澱物をロ別し、ロ液を水で2日間透析した。透析液に6mlのジメチルホルムアミドに溶解したN-ヒドロキシスクシンイミド70g、ジシクロヘキシルカルボジイミド150gを加え攪拌しながら室温で30分間反応させた後、アミノエトボシド440gのジメチルホルムアミド溶液6mlを加え、室温で一夜反応した。実施例1と同様の方法で反応液を精製し、固形物350gを得た。一部をサンプリングし、283nmのUV吸収より固形物中のアミノエトボシド濃度を26重量%と算出した。

〔抗癌剤試験〕

抗腫瘍試験は、CDF1-SLC 雌性6週令マウス腹腔内に、マウス白血病L1210細胞 $10^5$ 個を接種し、24時間後より1日1回5日間連続で本発明の化合物(Na1)を5%グルコース水溶液に溶解したものを腹腔内に投与した。

又別に、BALB/C-CRJ 雌性6週令マウスにColon26大腸癌細胞 $4 \times 10^5$ 個を皮下移植し、本発明の化合物(Na1)を5%グルコース水溶液に溶解したものを24時間後より1日1回5日間連続で静脈内投与した。それぞれ60日間飼育観察して次式により延命率を求めた。なお対照群には5%グルコース水溶液のみを投与した。

$$\text{延命率 (T/C)} = \frac{\text{本発明化合物投与群の平均生存日数}}{\text{対照群の平均生存日数}} \times 100$$

試験結果を次表に示す。

表1 1210担ガンマウスに対する抗腫瘍効果

各投与量における延命率 (T/C)				
	40mg/kg	20mg/kg	10mg/kg	5mg/kg
化合物(Na1)	231	347	249	236
ポリグルタミン酸	—	97	97	102

表2 Colon 26担ガンマウスに対する抗腫瘍効果

各投与量における延命率 (T/C)				
	40mg/kg	20mg/kg	10mg/kg	5mg/kg
化合物(Na1)	223	179	168	182
ポリグルタミン酸	110	—	—	—

表1、表2から明らかなように、本発明化合物は担癌マウスに対して幅広い投与量で延命効果を有した。

#### 〔発明の効果〕

本発明の化合物は、次の試験例から明かなように優れた抗腫瘍効果を示し、かつエトキシドに比べて水溶性が著しく高いものである。